

水道クリプトスポリジウム等試験に おける遺伝子検出についての補足

泉山 信司

(国立感染症研究所 寄生動物部)

概要

- 本件の背景・経緯
 - H19年の通知において遺伝子検出が導入されたが、いまだ遺伝子検出は使用不可との誤解
 - 遺伝子検出が顕微鏡検出と不一致することへの不安
 - 新型コロナ対応によりPCR検査が普及、一般化
- 検討内容
 - 最近の検査における顕微鏡検査と遺伝子検査の一致を確認
- 結果および考察
 - クリプトスポリジウム・ジアルジアのいずれの検出においても7割程度が顕微鏡法と一致
 - プライマー・プローブの設計やPCRの反応系によって差異が生じる可能性はあるが、クリプトスポリジウム属、ジアルジア属を標的とした市販の試薬を使用した結果
 - 塩基配列の取得により種別・型別ができる
 - 複数混合があってもゲノムシーケンサーにより読み取り可能
- 結論
 - 水道クリプト等試験に遺伝子検出法の利用例を示した
 - 浄水の試験の場合は、顕微鏡の併用・確認が必要

事例1 関東地方で委託受託検査の試料での一致状況

クリプトスポリジウム検査結果

		顕微鏡検査		計
		陽性	陰性	
RT-	陽性	71	9	80
PCR	陰性	12	24	36
計		83	33	116

ジアルジア検査結果

		顕微鏡検査		計
		陽性	陰性	
RT-	陽性	19	30	49
PCR	陰性	10	57	67
計		29	87	116

- ✓ 関東地方で畜産由来の汚染に苦慮している河川水や排水等の試料
(由来を明らかにしない条件で委託元了解)
 - ✓ 検査法は常法に従い、PTFEフィルター濃縮、磁気ビーズ精製
 - ✓ 顕微鏡法の確定結果を基準に2×2分割表を作成し、
クリプトスポリジウムRT-PCR法の感度は0.86、特異度は0.73
ジアルジアは感度0.66、特異度0.66
 - ✓ 検査の原理が異なるので完全な1：1対応はしなくても、
陽性陰性の結果は7～8割の一致 (0.82=(71+24)/116、0.66=(19+57)/116)
 - ✓ Nested-PCRによりPCR産物が安定して得られて、
塩基配列から種別・型別を行えた
 - ✓ *C. suis*、*C. muris*又は*C. andersoni*、*G. lamblia* Assemblage A (又はF)、B、E、G、*Giardia* sp.
- ・ 泉山信司、小澤克行、河川水クリプトスポリジウム等の検査における顕微鏡検査と遺伝子検査の比較、日本原生生物学会 + 日本寄生虫学会東日本支部 + 日本衛生動物学会東日本支部 3学会合同大会、2023 (R5) 年10月、東京

事例2 東北地方で山間部からジアルジア検出例

ジアルジア		検鏡検査		合計
		陽性	陰性	
遺伝子 検査	陽性	23	14	37
	陰性	8	32	40
合計		31	46	77

- ✓ 山間部で畜産による影響のない（野生動物等の影響を受けた）水道原水、ジアルジア検出に苦慮
- ✓ 検査法は常法に従い、PTFEフィルター濃縮、磁気ビーズ精製
- ✓ 顕微鏡法の確定結果を基準に2×2分割表を作成し、ジアルジアは感度0.74、特異度0.70
- ✓ 陽性陰性の結果は7割の一致（ $0.71=(23+32)/77$ ）
 - ✓ 塩基配列から種別・型別、*G. microti*

古川紗耶香、赤坂遼平、山崎朗子、泉山信司、青森市におけるジアルジア汚染源調査－河川水と野ネズミの*Giardia microti*検出－、日本水道協会水道研究発表会、2022年10月、名古屋市

事例3 下水疫学での一致状況

クリプトスポリジウム検査結果

		顕微鏡検査		計
		陽性	陰性	
RT-PCR	陽性	6	2	8
	陰性	2	14	16
計		8	16	24

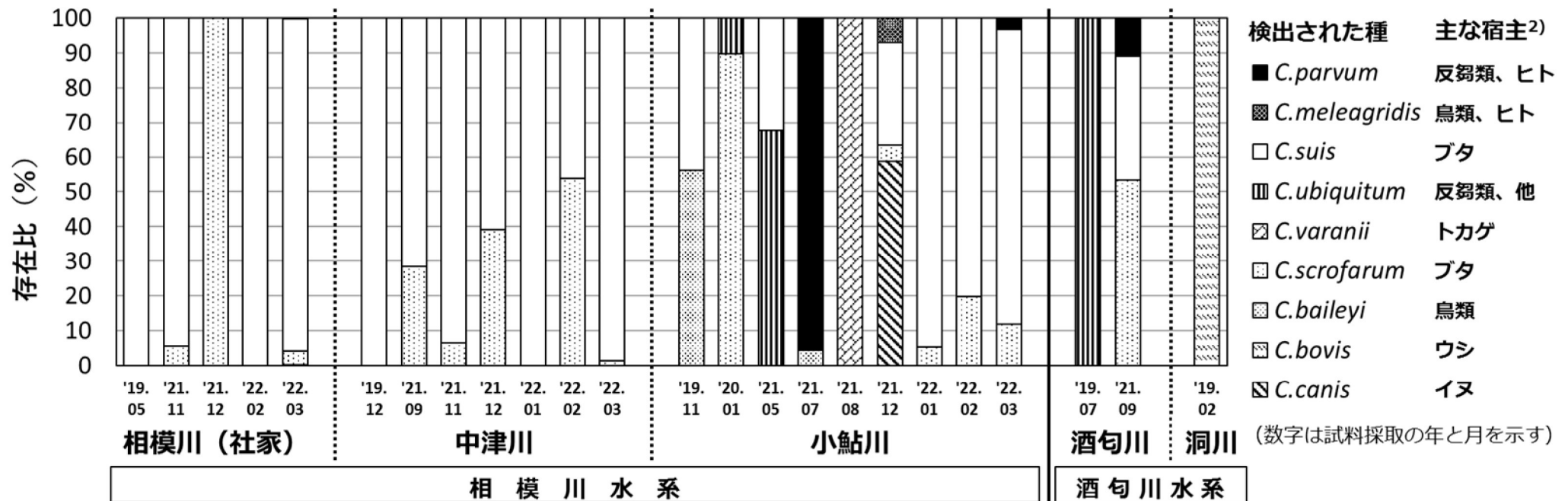
ジアルジア検査結果

		顕微鏡検査		計
		陽性	陰性	
RT-PCR	陽性	19	1	20
	陰性	2	2	4
計		21	3	24

- ✓ 都市部の下水処理場の処理水（放流口近傍の河川水）を対象
- ✓ 検査法は常法に従い、PTFEフィルター濃縮、磁気ビーズ精製
- ✓ 顕微鏡法の確定結果を基準に2×2分割表を作成し、
クリプトスポリジウムは感度0.75、特異度0.88
ジアルジアは感度0.90、特異度0.67
- ✓ 陽性陰性の結果は8～9割の一致（ $0.83=(6+14)/24$ 、 $0.88=(19+2)/24$ ）
- ✓ Nested-PCRによりPCR産物が安定して得られて、
塩基配列から種別・型別を行えた

✓ *C. parvum*、*C. meleagridis*、*C. canis*、*C. suis*、*G. lamblia* Assemblage A（又はF）、B、D

種別型別の補足



- ✓ 水道原水の汚染源調査の一環として、遺伝子検査
- ✓ 検査法は常法に従い、PTFEフィルター濃縮、磁気ビーズ精製
- ✓ 従来はPCR-RFLP法とサンガー法シーケンスを用いたが、混合試料の分解能、低い割合の混合検出に難あり、ゲノムシーケンサー読み取りへ
- ✓ 混合試料から塩基配列の読み取り、種別・型別を行えた

鎌田智子、栗田志広、入倉真紀、次世代シーケンシング (NGS) を用いた河川水のクリプトスポリジウム汚染実態調査、令和5年度全国会議 (水道研究発表会)、2023 (R5) 年10月、東京